

令和元年6月3日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11525

研究課題名(和文)高齢者における歯肉溝経由ワクチン接種法の開発とその応用

研究課題名(英文) Utilizing the sulcular epithelium as a vaccination route ideal for elderly vaccination

研究代表者

Cueno Marni (Cueno, Marni)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：20569967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究結果から、我々は以下のことを立証することができました。(1) 抗原を封入するキサンタン分子の総数は標的抗原中の残基の数に依存する。(2) ゲル封入は抗原構造安定性を高める。(3) 推定上、ゲル封入抗原は高親和性抗体を誘発する。(4) ゲル封入抗原がより安定であるほどより高い抗体価の量が引き出される。したがって、我々はゲルカプセル化した混合低用量抗原の経口補給は、GCを経由して全身性免疫応答を引き出せることを提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化は口腔内歯肉溝(GC)を拡大することから、歯肉溝内の歯周病原性細菌が歯肉粘膜に入り込み易くなり、その結果これらが全身に影響をもたらす可能性が高い。これまでの我々の研究において、GCは細菌の侵入経路であることを模倣し、ゲルカプセル化し経口補給した単一の抗原が同様の経路で全身性免疫応答を引き起こす可能性を明らかにした。この研究の結果から、本実験結果は将来、高齢者が使用可能な歯肉ワクチン接種法の開発に有用であると思われます。この提案された歯肉ワクチン接種は、簡便かつ安全であり、高齢者が予防接種を受けたときに有害な副作用がないものと考えられます。

研究成果の概要(英文)：We first simulated xanthan gel-encapsulation of two representative antigens (Dengue virus envelope subtype-2 and Influenza A nucleoprotein) through molecular docking in order to confirm exposure of target epitopes. Subsequently, we orally supplemented two sets of rats with two different antigen doses: mixed low-dose (50 ug/mL per antigen) and separated high-dose (100 ug/mL per antigen). Throughout this study, we were able to establish the following: (1) total number of xanthan molecules encapsulating an antigen depends on the number of residues in the target antigen; (2) gel-encapsulation enhances antigen structural stability; (3) gel-encapsulated antigens putatively elicit high affinity antibodies; and (4) the more stable a gel-encapsulated antigen is, the more antibody titer amount is elicited. Overall, we propose that gel-encapsulation of mixed low-dose antigens and, subsequently, orally-supplementing these components via the GC route are able to elicit a systemic immune response.

研究分野：ワクチン開発

キーワード：gel vaccine gingival vaccination elderly

1. 研究開始当初の背景

感染症は、若い集団と比較して免疫老化の見られる高齢集団においてより多く発症することから、年齢に関連して起こる免疫機能の変化は、高齢者の感染発症率および重症度の増加に深く関与する。さらに、これらの感染症はしばしば長期的な後遺症に関連しており、それが虚弱、自立の喪失、または日常活動の障害につながる可能性がある。この点から、高齢者での感染症の発症を防ぐことは非常に重要です。一方、予防接種は感染症予防に最も効果的である。現在、いくつかの国では高齢者へのワクチン接種を推奨されていることから、高齢者に対するワクチン接種法の研究もいくつかなされている。しかし、これまでに高齢者用に承認されたワクチンの欠点や限定されたワクチンの有効性を考慮すると、新たな高齢者用ワクチンの開発への関心が高まっている。

予防接種は感染症予防に最も効果的です。現在、いくつかの国では高齢者へのワクチン接種を推奨されていることから、高齢者に対するワクチン接種法の研究もいくつかなされていますが、これまでの高齢者用に承認されたワクチンの欠点や限定されたワクチンの有効性を考慮すると、高齢者に適用する新たなワクチンの開発ことへの関心が高まっています。

2. 研究の目的

我々は、歯肉溝 (GC) から細菌侵入が認められることにヒントを得て、GC からジェルに混和した単一の抗原を吸収させて全身性免疫応答を引き出すことが可能であることを示しました。しかし、この経路を介して接種させた混合抗原が、他の経路と同等の全身性免疫応答を誘発するか否かは未だ不明です。本研究では、ジェル混合抗原を用いて GC 経路による抗体の誘導を調べました。

3. 研究の方法

我々は高齢者を想定して 77 週齢の SD ラットを実験に使用しました。我々は最初に標的エピトープの露出を確認するために分子ドッキングを介して 2 つの代表的な抗原 (デング熱ウイルスエンベロップサブタイプ-2 およびインフルエンザ A 核タンパク質) のキサンタンゲルと混合させてサンプルを作製しました。そして、2 群のラットに 2 種類の異なる抗原用量 : 低用量混合 (1 抗原あたり $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) および高用量 (抗原あたり $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) を口腔内に接種しました。

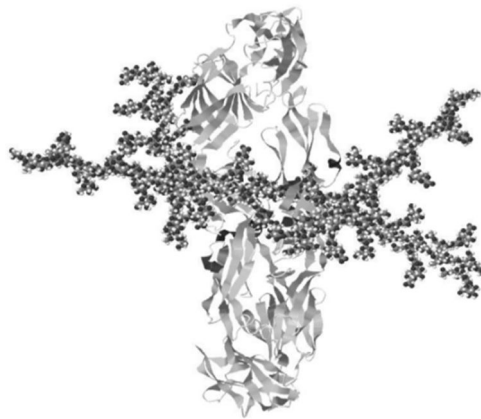


Figure 1. Representation of a xanthan gel encapsulated antigen. Ribbon structure represents the antigen. Spacefilled structure represents the xanthan gel.

4. 研究成果

我々は高齢者を想定して 77 週齢の SD ラットを実験に使用した。まず、標的エピトープの露出を確認する目的で、分子ドッキングを介して 2 つの代表的な抗原 (デング熱ウイルスエンベロップサブタイプ-2 およびインフルエンザ H

5 N 1 血球凝集素タンパク質) をキサンタンゲルと混合させてサンプルを作製した。次に、2 群のラットに 2 種類の異なる抗原用量 (低用量混 : 1 抗原あたり 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、および高用量 : 1 抗原あたり 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) を口腔内に投与した。その結果、複数のキサンタン分子の分子ドッキングがタンパク質抗原の中央に集中していることを見いだした。これらのエピトープは容易に露出されることからゲル封入はいかなる標的エピトープの露出を阻害しないことが示唆された。さらに、キサンタン分子ドッキングの違いを観察しところ、デング熱ウイルスエンベロープサブタイプ-2 では E n v 2 (8 4 4 残基) をカプセル化するのに 5 個のキサンタン分子が必要とされ、ヌクレオ (9 9 8 残基) では 4 個のキサンタン分子のみが必要があった。一方、インフルエンザ H 5 N 1 血球凝集素タンパク質 (1 , 5 3 9 残基) をカプセル化するためには 3 つのキサンタン分子が必要であった。

ラット動物実験の結果、デング熱ウイルスエンベロープサブタイプ-2 ゲル (G E M - L A) を通して誘発された抗体力価は、x 20 ~ x 640 の血清希釈でインフルエンザ H 5 N 1 血球凝集素タンパク質ゲル (G E S - H A) を通して誘発されたものと同等であることを確認した。これは、抗原が混合および希釈されたときにゲルカプセル化抗原の免疫原性が影響を受けなかったことを意味していると考えられる。これに関して、我々はゲルカプセル化抗原が構造的に安定化しており、抗原が容易に露出されることから抗体応答の誘発がされるものと示唆した。さらに、G E M - L A は希釈された抗原 (抗原あたり 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) で G E S - H A は希釈なしの抗原 (抗原あたり 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) であるにもかかわらず、両者が同様の抗体力価を有することからゲルカプセル化は抗原に対してより高親和性の抗体誘発が惹起されたものと推察された。抗原濃度は抗体誘発に影響を及ぼさなかった。

G E M - L A および G E S - H A を用いたワクチン接種において、x 20 ~ x 320 の血清希釈液での抗体価は、ヌクレオ抗原と比較して E n v 2 抗原の方が高かった。同じ抗原だが濃度の異なる量を接種したラット間の抗体価の違いについて我々は、免疫原性度合いに深く関与する抗原のエピトープの露出構造に起因するものと仮定した。

ワクチン接種されたラットにおいて、E n v 2 は N u c l e o と比較してより多くの体エピトープ露出させているために、N u c l e o と比べてより高い抗体価をもたらしているものと示唆した。

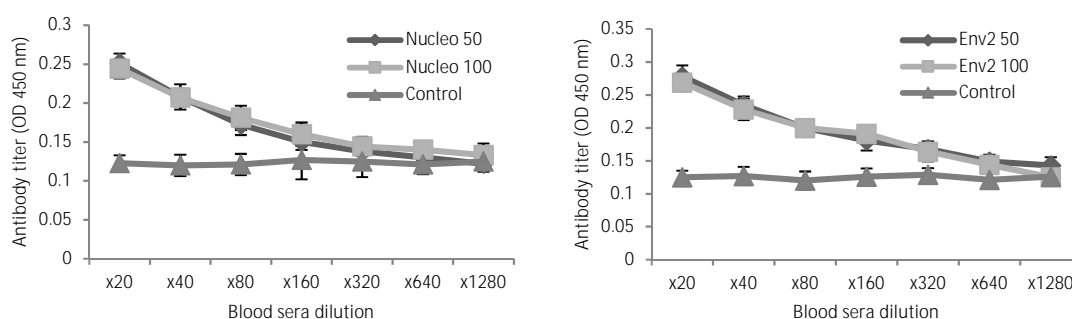


Figure 2. Antibody titer measurements post-gingival vaccination. (Upper panel) Influenza nucleoprotein antigen. **(Lower panel)** Dengue envelope protein 2 antigen. Antigen concentrations at 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ are indicated.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Cueno ME, Shiotsu H, Nakano K, Sugiyama E, Kikuta M, Usui R, Oya R, Imai K. Structural significance of residues 158-160 in the H3N2 hemagglutinin globular head: A computational study with implications in viral evolution and infection Journal of Molecular Graphics and Modelling 89: 33-40 2019 年 査読有
<http://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.02.007>

Cueno ME, Imai K. Network analytics approach towards identifying potential antivirulence drug targets within the *Staphylococcus aureus* staphyloxanthin biosynthetic network. Archives of Biochemistry and Biophysics 645: 81-86 2018 年 査読有
<http://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.010>

Cueno ME, Imai K. Various cellular components change as the rat ages: An insight into the putative overall age-related cellular stress network. Experimental Gerontology 102: 36-42 2018 年 査読有
<http://doi.org/10.1016/j.exger.2017.11.021>

〔学会発表〕(計 5 件)

Cueno ME, Imai K. Gingival vaccination as a potential non-invasive route for elderly. Mucosal Immunology Course and Symposium (MICS) 2018, 2018 年

Cueno ME, Tamura M, Imai K. Topological analysis of the bacterial network in the gingival sulcus. 19th ISG (International Society of Gnotobiology)/ 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology/39th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease (SOMED), 2018 年

Cueno ME, Imai K. Network analysis of the bacterial network in the gingival sulcus. 第 59 回 歯科基礎医学会学術大会, 2017 年

Cueno ME, Imai K. Network analysis of the varying components involved in *Staphylococcus aureus* staphyloxanthin biosynthesis: Prospects for antivirulence strategies. 18th International Carotenoid Symposium, 2017 年

Cueno ME, Tamura M, Imai K. Gingival vaccination for the elderly population. 10th Vaccine Congress, 2016 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：落合 智子

ローマ字氏名：OCHIAI, Tomoko

所属研究機関名：日本大学

部局名：松戸歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20130594

研究分担者氏名：落合 邦康

ローマ字氏名：OCHIAI, Kuniyasu

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50095444

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。